刚果红对棉铃虫中肠围食膜的影响及其病毒增效作用

张小霞[1,2]，梁振普[3]，彭辉银[1*]，张忠信[1]，汤显春[1]，李　罡[1]，赵淑玲[1,2]，肖宇宙[1,2]，张万菊[1,2]
(1. 中国科学院武汉病毒研究所，武汉　430071；2. 中国科学院研究生院，北京　100039；3. 河南农业大学生命科学院，郑州　450002)

摘要：通过观察棉铃虫幼虫正常围食膜(peritrophic membrane，PM)的形态、结构和组成，研究了刚果红对棉铃虫幼虫围食膜的破坏作用及其对棉铃虫核多角体病毒(HaNPV)的增效作用。结果表明，棉铃虫的围食膜分布于整个中肠，包裹着食物呈液囊状，类似于Ⅰ型围食膜。健康的围食膜呈无色、透明网状结构，并具有一定韧性，经刚果红染色后呈现桔红色。使用不同浓度梯度的刚果红喂食5龄幼虫，结果显示摄取含1.5%和2.0%刚果红的饲料2.5 h后，宿主不能形成完整的围食膜，而是形成易脆无弹性的围食膜碎片。经过恢复实验后发现，刚果红对围食膜的破坏作用是瞬时的，可以在较短时间内得到修复。用1.0%刚果红喂食初孵幼虫，发现1.0%刚果红对棉铃虫的幼虫生长不能产生明显的影响。1.0%刚果红能加强棉铃虫幼虫对HaNPV的敏感性，缩短病毒杀虫时间，能使5龄幼虫的病毒感染致死率达到63%，对HaNPV具有非常显著的增效作用。

关键词：棉铃虫；刚果红；棉铃虫核多角体病毒；病毒增效作用；中肠；围食膜
中图分类号：Q965　　文献标识码：A　　文章编号：0454-6296(2006)01-0045-05

Effect of Congo red on peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and its viral-enhancing activity

ZHANG Xiao-Xia[1,2], LIANG Zhen-Pu[3], PENG Hui-Yin[1*], ZHANG Zhong-Xin[1], TANG Xian-Chun[1], LI Gang[1], ZHAO Shu-Ling[1,2], XIAO Yu-Zhou[1,2], ZHANG Wan-Ju[1,2] (1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. School of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The morphology, structure and component of normal peritrophic membrane (PM) were observed, and the disruptive effect of Congo red (CR) on the PM of larvae and its viral-enhancing activity to HaNPV in *Helicoverpa armigera* were studied. The results indicated that the PM of *H. armigera* resembled type Ⅰ, which spread nearly the whole midgut and presented as a vacuole. The normal PM was colorless, transparent and stretchy. The PM dyed by CR appeared as a bisque netlike structure. When the 5th instar larvae were reared on the diets with different concentrations of CR, the larvae synthesized fragile PM fragments instead of intact PM after consuming the artificial diets with 1.5% and 2.0% CR for 2.5 h. However, the resumptive experiments testified the disruptive effect could be restored by rearing the larvae on the diet without CR. Although 1.0% CR did not affect the growth of larvae, it could enhance the sensitivity of larvae to virus infection, shorten the killing time by virus, and cause the mortality of 5th instar larvae as high as 63%.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Congo red; HaNPV; viral-enhancing activity; midgut; peritrophic membrane

动物的消化系统时刻都面临着来自物理、化学、生物等外界因素的干扰，因此进化出一套相应的保护系统是很有必要的。脊椎动物的消化道表面覆盖了一层粘液层，它可以起到保护作用。无脊椎动物没有像脊椎动物一样的粘液层，相应的在进化的过程中出现了一种类似粘液层的保护层——围食膜

基金项目：中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-315)
作者简介：张小霞，女，1973年6月生，河南人，博士，研究方向为病毒与宿主的分子进化，E-mail：lfzxx@sohu.com
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：penghy@pentium.whiov.ac.cn
收稿日期 Received：2005-04-22；接受日期 Accepted：2005-12-07

(peritrophic membrane, PM)(Spence, 1991)。围食膜是一种无色、透明、具有一定韧性的半透膜,位于中肠细胞和肠腔之间,是无脊椎动物例如昆虫的一种防御性屏障,起着保护中肠上皮细胞免遭食物等通过时造成的各种伤害以及抵抗微生物入侵的作用(Wang and Granados, 1998)。同样具有保护作用的昆虫围食膜与脊椎动物粘液层在成分上有很大的差别,其中最大的区别就是围食膜中渗入了大量的几丁质(Peters, 1992)。自然界中这种几丁质通过氢键结合形成几丁质纤丝,使整个围食膜形成了以几丁质为基体,上面布满蛋白质的坚实的网状结构(Wang and Granados, 1997a, 1997b)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)是棉花等农作物的重要害虫,目前针对棉铃虫已经开发了棉铃虫核多角体病毒杀虫剂进行生物防治,但对棉铃虫中肠防御系统——围食膜的研究还远远不够。昆虫病毒被昆虫摄食后进入中肠,在中肠的碱性环境和碱性蛋白酶的作用下,多角体在肠道内溶解,脱去包涵体蛋白释放病毒粒子,病毒粒子穿过昆虫中肠围食膜进入中肠上皮细胞,在中肠上皮细胞中形成出芽病毒释放到血淋巴或周围的组织中,开始二次感染和系统感染,最终造成昆虫的死亡(Flipsen *et al*., 1995)。从病毒感染的过程可以看出,围食膜是阻止病毒与中肠上皮细胞接触的重要屏障,二者之间的抗衡至关重要,决定了病毒感染的速率(Granados and Lawler, 1981)。另一方面,病毒与宿主之间存在着协同进化,病毒与围食膜之间的作用过程反应了一种病毒与宿主之间的分子作用形式,因此对于生命进化等科学问题,病毒和昆虫围食膜也是一种很好的研究模式。已知昆虫围食膜的主要成分为蛋白质和几丁质,刚果红(Congo red, CR)能与蛋白质竞争结合几丁质而使几丁质呈现桔红色,所以围食膜可用刚果红进行染色来进行观察(Campbell, 1929)。本文以棉铃虫为研究对象,研究了几丁质结合物质——刚果红对围食膜的破坏作用等,为今后开发新型增效剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫和试剂

棉铃虫幼虫由中国科学院武汉病毒研究所动物饲养中心养虫室提供,28℃孵育,人工饲料喂养;刚果红(CR,纯度≥75%)购自 Ameresco。棉铃虫核多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HaNPV)为本实验室保存。

1.2 围食膜制备

解剖健康的5龄棉铃虫幼虫,取出围食膜,用去离子水充分清洗至无色透明,保存于-70℃。

1.3 围食膜的染色和显微镜观察

将已经剥离好的围食膜,用甲醇刚果红染液进行染色10~20 min,然后用碱性乙醇分化液分化数秒,用去离子水充分漂洗围食膜,苏木素复染2~3 min,去离子水彻底漂洗,置于显微镜(Olympus SZ-ST 和 OlympusBX51)下进行观察并照相。

1.4 不同浓度刚果红对棉铃虫5龄幼虫围食膜的影响

实验设两组,每组每个实验浓度设10头5龄幼虫。组Ⅰ:分别用含0.2%、0.5%、1.0%、1.5%和2.0%刚果红的饲料喂食5龄幼虫2.5 h后,取围食膜进行观察。组Ⅱ:分别用含1.5%和2.0%刚果红的饲料处理2.5 h,取昆虫围食膜进行观察、拍照,然后将昆虫转入正常饲料中饲养,28℃温育3 h,取昆虫围食膜进行观察。

1.5 刚果红对棉铃虫初孵幼虫生长的影响

取未取食刚果红的健康棉铃虫初孵幼虫46头,用含1%刚果红的饲料进行饲养,另设不含刚果红的饲料组为对照组,饲养直到幼虫全部化蛹,每天统计化蛹的虫数。

1.6 刚果红对 HaNPV 的增效作用实验

实验分以下4组:HaNPV+1.0% CR 处理组,HaNPV 处理组,1.0% CR 处理组和空白对照组。其中刚果红用无菌水配置后进行过滤,病毒悬液用无菌水配置。每组分别取未取食刚果红的2、3、4、5龄棉铃虫健康幼虫各24头,其中2-5龄幼虫的 HaNPV 感染剂量分别为:1×10^6 PIBs/mL, 2×10^6 PIBs/mL, 4×10^6 PIBs/mL, 8×10^6 PIBs/mL。病毒感染方法为往人工饲料上滴加20 μL 病毒悬液。刚果红的处理方法为往人工饲料上滴加5~10 μL 1.0%刚果红。空白对照组用无菌水处理。实验重复3次。每天在相同时间内统计死亡虫数,2、3、4、5龄幼虫的累积死亡率分别在感染后的第2、3、4、6天进行统计;5龄幼虫的死亡率按照全部幼虫死亡后进行计算。

1.7 数据处理与分析

得出的数据通过 Excel 等软件进行处理。通过 t 值检验检测刚果红的增效作用是否显著。增效率的计算公式为:

$$\text{增效率}=\frac{\text{添加刚果红组死亡率}-\text{无刚果红组死亡率}}{\text{无刚果红组死亡率}}\times100\%$$

2 结果与分析

2.1 棉铃虫幼虫围食膜的形态特征和染色观察

实验表明健康棉铃虫 5 龄幼虫的围食膜呈无色、透明、弹性的管状结构，围食膜布满几乎整个中肠，包裹着食物呈管状液囊(图 1：A)。

5 龄健康棉铃虫幼虫围食膜经刚果红染色后，可以清楚的看到整个围食膜呈类似薄膜样的管状结构(图 1：B)。自然界中围食膜是以几丁质丝为基质，上面布满蛋白质的网状结构。将经刚果红染色的围食膜置于光学显微镜下进行观察，结果显示围食膜经放大 600 倍后可以清晰的看到由蛋白质和几丁质丝组成的致密的网状结构(图 1：C)，围食膜的这种结构保证了其对中肠的防护功能

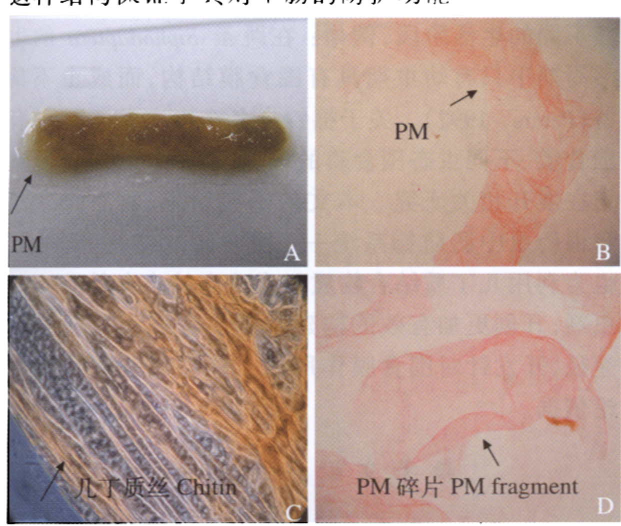


图 1　棉铃虫 5 龄幼虫的围食膜照片

Fig. 1　The peritrophic membrane of 5th instar larva of *Helicoverpa armigera*

A. 包裹着食物残渣的 5 龄幼虫围食膜 The peritrophic membrane (PM) of 5th instar larva; B. 经刚果红染色的 5 龄幼虫围食膜 The integrative PM of 5th instar larva stained with Congo red; C. 经刚果红染色后的 5 龄幼虫围食膜(600×) The PM net structure of 5th instar larva (600×); D. 取食含 2.0% 刚果红的人工饲料 3 h 后的 5 龄幼虫的围食膜 The PM fragment of 5th instar larva fed on food containing 2.0% Congo red for 3 h.

2.2 不同浓度刚果红对棉铃虫幼虫围食膜的影响

分别用 0.2%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的 CR 浓度梯度处理 5 龄幼虫 2.5 h 后，取中肠围食膜观察，结果显示在 CR 浓度 ≤1.0% 时，幼虫可以形成完整的围食膜；当 CR 浓度达到 1.5% 和 2.0% 时，棉铃虫不能形成完整的围食膜，只是形成了易脆、易断、无弹性的围食膜碎片(图 1：D)。将用 2.0% CR 处理了 2.5 h 后的幼虫转入不含刚果红的新鲜人工饲料上饲养，28℃ 温育 3 h 后，取其围食膜进行观察。结果发现，经过正常饲料的处理后，幼虫又重新形成了完整而富有弹性的健康围食膜，说明刚果红对围食膜的破坏作用是瞬时的，可以通过不含刚果红饲料的刺激使得刚果红从中肠排泄出去，从而在较短时间内使围食膜得到恢复。

2.3 1.0% CR 处理对棉铃虫幼虫生长的影响

棉铃虫初孵幼虫置于含有 1.0% CR 的人工饲料上进行饲养，直到幼虫全部化蛹，以此确定 1.0% CR 对棉铃虫初孵幼虫生长的影响。结果发现，处理组和对照组几乎都能在相同时间内全部正常化蛹(数据省略)，这说明 1.0% CR 虽然通过与蛋白质竞争结合几丁质，对围食膜造成一定程度的破坏(Wang and Granados, 1998)，但不足以对棉铃虫幼虫的生长起到明显的影响作用。

2.4 刚果红对 HaNPV 的增效作用

本研究中 HaNPV 的感染剂量均为 LD_{50} 致死剂量(预实验内容)，通过加入 CR 观察幼虫死亡时间

表 1　1.0% 刚果红对 HaNPV 的增效作用分析

Table 1　The viral-enhancing activity of 1.0% Congo red for HaNPV

虫龄 Instar	处理 Treatment	平均累积死亡率 Average accumulative mortality (%)	增效率 Enhancive rate (%)
2	无菌水 Sterile water (CK)	0	2 379 C
	1.0% CR	0	
	1×10⁶ HaNPV	1.4 ± 2.74 A	
	1×10⁶ HaNPV + 1.0% CR	34.7 ± 2.74 B	
3	无菌水 Sterile water (CK)	0	289 A
	1.0% CR	0	
	2×10⁶ HaNPV	23.6 ± 2.74 A	
	2×10⁶ HaNPV + 1.0% CR	91.7 ± 4.70 B	
4	无菌水 Sterile water (CK)	0	118 A
	1.0% CR	0	
	4×10⁶ HaNPV	37.5 ± 8.17 A	
	4×10⁶ HaNPV + 1.0% CR	81.9 ± 9.83 B	
5	无菌水 Sterile water (CK)	0	693 B
	1.0% CR	0	
	8×10⁶ HaNPV	2.8 ± 2.74 A	
	8×10⁶ HaNPV + 1.0% CR	22.2 ± 2.74 B	

表内数据为 3 个重复的平均值 ± 标准差($n = 3$)，数据后不同字母表示通过 t 检验差异极显著($P < 0.01$)。

The data in the table indicate mean ± SD ($n = 3$) and the means followed by different letters differ significantly at $P < 0.01$ level by t-test.

的变化，以此确定 CR 对病毒的增效作用。生物测定的结果表明，1.0% CR 组和空白对照组的幼虫全部化蛹，没有死虫。而对其他两个处理组观察发现，HaNPV + 1% CR 处理组的各龄幼虫平均累积死亡率均高于 HaNPV 处理组。增效率计算结果显示，1.0% CR 对 2 龄幼虫感染 HaNPV 的增效率最高，可达 2 379%，并且 1.0% CR 对 5 龄幼虫感染 HaNPV 的增效率高于对 4 龄幼虫感染 HaNPV 的增效率（表 1）。对增效结果的 t 值检验结果表明，1.0% CR 的对 HaNPV 的增效作用非常显著（$P < 0.01$）（表 1）。对于 5 龄幼虫，HaNPV + 1.0% CR 处理组的死亡率达到了 63%，而 HaNPV 处理组的死亡率只有 12.5%。

3 讨论

棉铃虫是重要的鳞翅目害虫，有极强的抗药性。目前棉铃虫核多角体病毒杀虫剂虽然已经研制了多年，并进行了农药登记和大田应用，但其较慢的杀虫效率极大地限制了它的推广（吕鸿声，1982 蒲蛰龙，1992）。为了提高病毒杀虫剂的效率，有必要对害虫的抗病毒机制进行研究。蛋白质对于保证围食膜结构的完整性是必要的，对蛋白质和几丁质相互作用的任何微小破坏都会造成对昆虫有害的生理影响（Bolognesi *et al*.，2001；Wang and Granados，2001；Okuno *et al*.，2003）。有实验证明凝集素 WGA（wheat germ agglutinin）通过和几丁质的结合，可以降低围食膜的通透性并导致形成非正常的几丁质网眼，从而提高了病毒的杀虫效果（Harper *et al*.，1998；Wang and Granados，2000）。

刚果红可竞争性结合到昆虫中肠围食膜的几丁质上，导致围食膜蛋白质和几丁质的解离，改变围食膜的通透性（Wang and Granados，1998）。本研究用几丁质结合物质——刚果红处理棉铃虫幼虫，结果显示，1.0%刚果红不能对初孵幼虫的生长造成明显的影响，这表明在 1.0%刚果红对围食膜进行破坏的同时，宿主也在投入较大的能量不断的对围食膜进行着修复。不同浓度梯度的刚果红处理 5 龄幼虫后，发现当刚果红浓度大于 1.0%时可以导致非正常的围食膜形成，但这种破坏作用是瞬时的，当棉铃虫转而取食正常饲料 3 h 后即可完全恢复正常围食膜的合成，此现象与 Wang 和 Granados（2000）的研究结果相吻合。

本研究的生物测定结果表明，刚果红对 HaNPV 病毒具有非常显著的增效作用。由于刚果红的存在，破坏了围食膜结构的完整性，使围食膜失去了原有的天然屏障功能，增加了通过围食膜而吸着中肠上皮细胞的病毒的数量和入侵机会，加快了病毒的感染过程，缩短了昆虫的死亡时间。对于 2～4 龄幼虫，刚果红的增效作用成递减趋势，原因是随着虫龄的增加，幼虫的抵抗能力增加，恢复合成 PM 的能力也在增加，加入刚果红对 PM 造成的伤害因而也逐步获得弥补。而对于 5 龄幼虫来说，刚果红的增效作用比 4 龄的又有了上升，作者分析原因为：末龄幼虫紧接着要步入化蛹，而由于蛹期不再摄入食物，因此 PM 的合成能力就可能大大降低，或者棉铃虫在蛹期根本不合成 PM，因此 PM 对中肠的保护能力就比 4 龄幼虫大大降低，而刚果红的增效作用就会比较明显。对于不同的昆虫来说，围食膜会出现在其不同的生活阶段，例如：在跳蚤 *Siphonaptera* 的生活周期中只有幼虫期具有围食膜结构，而成虫不具备（Peters，1992）。关于棉铃虫各个虫态是否都具有围食膜、不同虫态围食膜的成分是否相同，本实验室正在展开相关研究。本文的研究结果，将有助于了解棉铃虫中肠防御系统——围食膜的结构和组成，也为利用几丁质结合物质联合改良核多角体病毒杀虫剂，开创更加有效的构建基因工程病毒杀虫剂的途径，开发针对围食膜作用的生物增效剂提供了理论依据。

参考文献（References）

Bolognesi R，Ribeiro AF，Terra WR，Ferreira C，2001. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*：Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol*.，47(2)：62－75.

Campbell FL，1929. The detection and estimation of insect chitin and the irrelation of chitinization to hardness and pigmentation of the cuticula of the American cockroch *Periplaneta americona*. *Ann. Entomol. Soc. Amer*.，22：401－426.

Flipsen JTM，Martens JWM，van Oers MM，Vlak JM，van Lent JWM，1995. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology*，208(1)：328－335.

Granados RR，Lawler KA，1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*，108：297－308.

Harper MS，Hopkins TL，Czapla TH，1998. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane. Ⅰ. European corn borer（*Ostrinia nubilalis*）larvae. *Tissue and Cell*，30：166－177.

Lu HS，1982. Insect Viruses and the Diseases Caused by Insect Viruses. Beijing：Science Press.［吕鸿声，1982. 昆虫病毒与昆虫病毒病.

北京：科学出版社]

Okuno S，Takatsuka J，Nakai M，Ototake S，Masui A，Kunimi Y，2003. Viral-enhancing activity of various stibene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* （Lepidoptera： Noctuidae） nucleopolyhedrovirus. *BioControl*，26：146 – 152.

Peters W，1992. Peritrophic Membrane. Zoophysiology Series. Vol. 30. Springer，Berlin. 238.

Pu ZL，1992. Insect Pathology. Guangzhou：Guangdong Scientech Press. [蒲蛰龙，1992. 昆虫病理学. 广州：广东科技出版社]

Spence KD，1991. Structure and physiology of the peritrophic membrane. In：Binnington K，Retnakaran A eds. Physiology of the Insect Epidermis. Inkata Press，Melbourne. 77 – 93.

Wang P，Granados RR，1997a. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，94：6 977 – 6 982.

Wang P，Granados RR，1997b. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *J. Biol. Chem.*，272：16 663 – 16 669.

Wang P，Granados RR，1998. Observation on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol.*，72：57 – 62.

Wang P，Granados RR，2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem. Mol. Bio.*，30：135 – 143.

Wang P，Granados RR，2001. Molecular structure of the peritrophic membrane（PM）：identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*，47：110 – 118.

（责任编辑：吴明宇）